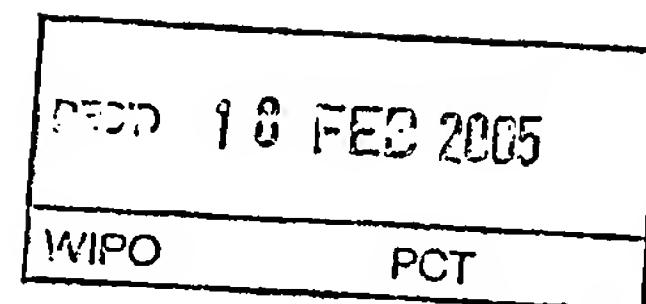


KONGERIKET NORGE
The Kingdom of Norway



Bekreftelse på patentsøknad nr
Certification of patent application no

20044581

▷ Det bekreftes herved at vedheftede dokument er nøyaktig utskrift/kopi av ovennevnte søknad, som opprinnelig inngitt 2004.10.25

▷ *It is hereby certified that the annexed document is a true copy of the above-mentioned application, as originally filed on 2004.10.25*

Priority is claimed from patent application no 20040128 filed on 2004.01.12

2005.02.05

Line Reum

Line Reum
Saksbehandler

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Søknad om patent

www.patentstyret.no



Ferdig utfylt skjema sendes til adressen nedenfor. Vennligst ikke heft sammen sidene.
Vi ber om at blankettene utfilles **maskinelt** eller ved bruk av **blokkbokstaver**. Skjema for
utfylling på datamaskin kan lastes ned fra www.patentstyret.no.

2004 -10- 25

► **Søkerinfo:** Den som søker om patent blir også innehaver av en eventuell rettighet. Må fylles ut hvis søker er person.

Foretakets navn (fornavn hvis søker er person):

Geir

Etternavn (hvis søker er person):

Helland

Kryss av hvis søker tidligere har vært kunde hos Patentstyret.

Oppgi gjerne kundenummer:

Adresse:

Nadderudveien 138A

Postnummer:
1353

Poststed:
Eiksmarka

Land:
Norge

Kryss av hvis flere søkerer er angitt i
medfølgende skjema eller på eget ark.

Kryss av hvis søker(ne) utfører
20 årsverk eller mindre (se veileder).

► **Kontaktinfo:** Hvis ikke Patentstyret har vendt seg til deg, oppgi telefonnummer (og eventuell referanse).

Fornavn til kontaktperson for fullmektig *eller* søker:
Trond

Etternavn:
Gustad

Telefon: 21 00 90 00

Referanse (maks. 30 tegn):
O: 159272 TG/kmg

SØKNAD s. 1 av 2

FLEIRE SØKERE

FLEIRE OPPFINNERE

PRIORITETER

VEILEDNING

► **Fullmektig:** Hvis du ikke har oppnevnt en fullmektig, kan du gå til neste punkt.

Foretakets navn (fornavn hvis fullmektig er person):
Oslo Patentkontor AS

Etternavn (hvis fullmektig er person):

Kryss av hvis fullmektig tidligere har vært kunde hos Patentstyret.

Oppgi gjerne kundenummer:

1077

Adresse:
Postboks 7007M

Postnummer:
0306

Poststed:
OSLO

Land:
Norge

► **Oppfinnere:** Oppfinneren skal alltid oppgis selv om oppfinnere og søker er samme person.

Oppfinnernes fornavn:

Geir

Etternavn:

Helland

Kryss av hvis oppfinnere tidligere har vært kunde hos Patentstyret.

Oppgi gjerne kundenummer:

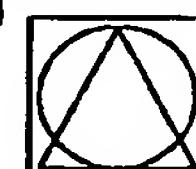
Adresse:
Nadderudveien 138A

Postnummer:
1353

Poststed:
Eiksmarka

Land:
Norge

Kryss av hvis flere oppfinnerere er angitt i medfølgende skjema eller på eget ark.





✓ **Tittel:** *Oppfinnelse (Gjenkombinert oppfinnelse) eller tiltekt for oppfinnelsen (ikke over 256 tegn) inkludert melomrom:*

Titel:
"Anvendelse av soppen Agaricus blazei Murill ved fremstilling av medikamenter til bekjempelse av infeksjoner og allergier"

✓ **PCT:** *Fyller ut hvis du ikke har søkt om denne oppfinnelsen i tidligere land eller i Norge, kan du ga videreføring til neste punkt:*

PCT-søknadens dato og nummer:

Inngivelsesdato (aaaa.mm.dd):

Søknadsnummer:

PCT

/

✓ **Prioritetskav:** *Fyller ut hvis du ikke har søkt om denne oppfinnelsen i tidligere land eller i Norge, kan du ga videreføring til neste punkt:*

Prioritet kreves på grunnlag av tidligere innlevert søknad i Norge eller utlandet:

Inngivelsesdato (aaaa.mm.dd):

Landkode: Søknadsnummer:

Opplysninger om tidligere søknad. Ved flere
krav skal tidligste prioritet angis her:

2004.01.12

NO

20040128

Flere prioritetskav er angitt i medfølgende skjema, eller på eget ark.

✓ **Biologisk materiale:** *Fyller ut hvis oppfinnelsen omfatter biologisk materiale:*

Søknaden omfatter biologisk materiale. Deponeringssted og nummer må oppgis:

Deponeringssted og nummer (bøylt gjerne øjet ark):

Prøve av materiale skal bare utleveres
til en særlig sakkyndig.

✓ **Avdelt/utskilt:** *Fyller ut hvis du ikke har søkt om patent i Norge tidligere, kan du ga videreføring til neste punkt:*

Søknaden er avdelt eller utskilt fra tidligere levert søknad i Norge:

Avdelt søknad

Dato (aaaa.mm.dd):

Søknadsnummer:

Informasjon om opprinnelig
søknad/innsendt tilleggsmateriale

Utskilt søknad

✓ **Annat:** *Fyller ut hvis du ikke har valgt et annet punkt:*

Søknaden er også levert per telefaks.

Oppgi dato (aaaa.mm.dd):

Jeg har fått utført forundersøkelse.

Oppgi nr (årstall - nummer - bokstav):

✓ **Vedlegg:** *Angi hvilken dokumentasjon av oppfinnelsen du legger ved, samt andre vedlegg:*

Tegninger

Oppgi antall tegninger:

9

Beskrivelse av oppfinnelsen

Fullmaksdokument(er)

Patentkrav

Overdragelsesdokument(er)

Sammendrag på norsk

Erklæring om retten til oppfinnelsen

Dokumentasjon av eventuelle prioritetskav (prioritetsbevis)

Annet: Brev til Styret (ber om rask behandling)

Oversettelse av internasjonal søknad
(kun hvis PCT-felt over er fylt ut)

✓ **Dato/underskrift:** *Slekkat du har valgt et annet punkt under "Søknad om patent" (se ovenfor):*

Sted og dato (blokkbokstaver):

Signatur:

Oslo, 25. oktober 2004

Cisteri Kluleri
OSLO PATENTKONTOR AS
P.O. BOX 11337, NO-0200 OSLO

Navn i blokkbokstaver:

Oslo Patentkontor AS

NBI Søknadsavgiften vil bli fakturert for alle søknader (dvs. at søknadsavgiften ikke skal følge søknaden).
Betalingsfrist er ca. 1 måned, se faktura.



PATENTSTYRET®
Styret for det industrielle rettsvern

25. oktober 2004
O: 159272 - TG/KMG
Soppen Agaricus blazei Murill 2

Norsk patentsøknad nr.

SØKER:

Geir Hetland
Nadderudveien 138A
1353 Eiksmarka
Norge

Oppfinnere:

Geir Hetland
Nadderudveien 138A
1353 Eiksmarka
Norge

Tittel:

Anvendelse av soppen Agaricus blazei Murill ved fremstilling av medikamenter til bekjempelse av infeksjoner og allergier

Fullmektig: Oslo Patentkontor AS, Boks 7007M, N-0306 Oslo

Foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av soppen *Agaricus blazei murill* (AbM) ved fremstilling av et medikament til bekjempelse eller forebygning av bakterielle og ikke-bakterielle infeksjoner (for eksempel parasitter eller virus) i pattedyr samt til bekjempelse forebygning av allergi hos pattedyr. Eksempelvis kan en slik infeksjon være forårsaket av pneumokokker og enda mer spesielt hvor pattedyret er et menneske.

Innledning

10 Bruk av medisinske sopper har vært en del av tradisjonell
asiatisk kultur i mer enn 3000 år.

Mange substanser fra sopper er vist å påvirke immunsystemet og kunne brukes til behandling av en rekke sykdommer (Wasser et al. 1999). I Japan er det gjort mye forskning på 15 helseeffekter av sopper (Ikekawa 2001). *Agaricus blazei Murill* (AbM) fra familien *Basidiomycetes* er en slik medisinsk sopp som er meget populær i Japan og dyrkes kunstig (Chen 2000) for helsekostmarkedet. Denne soppen vokser naturlig nær en liten brasiliansk landsby, Pietade, utenfor 20 São Paulo hvor det daglig er store klimatiske endringer. I dette området ble AbM brukt i maten og lokalbefolkningen syntes å ha lav forekomst av kreft og andre helseproblemer (Huang 1997). I 1965 sendte dr. Takatoshi Furumoto AbM sporer til Japan og forskere ved The National Cancer Center 25 Research Institute of Japan og støttet av The Japanese Pharmacological Society publiserte etter hvert resultater som viste at AbM hadde kreftbekjempende egenskaper. AbM er rik på immunstimulerende og kreftmotvirkende sukkermolekyler (polysakkarider) som beta (1,3) og (1,6) glukaner 30 (Kawagishi et al. 1989; Iwade & Mizuno, 1997; Huang 1997; Stamets 2000, Ohno et al. 2001; Sorimachu et al. 2001).

Ekstrakter av den spiselige soppen *Agaricus blazei Murill* (AbM) har blitt brukt de siste 10-20 år i Japan som

helsekost mot en rekke sykdommer som kreft, sukkersyke, åreforkalking og kronisk leverbetennelse.

Alle disse sykdommer er imidlertid grunnet svekkelse/abnormaliteter i celler hos den angrepne person, og har ikke 5 sitt opphav i angrep fra ytre organismer så som bakterier.

Den krefthemmende effekten av AbM-komponenter er vitskapelig dokumentert i musemodeller og på kreftceller (Itoh et al., 1994; Fujimiya et al. 1998; Ebina & Fijimiya, 1998; Takaku et al. 2001; Menoli et al. 2001; Bellini et al. 10 2003). AbM mycelium er også påvist å ha ødeleggende effekter (cytopatiske) av WEE (western equine encephalitis) virus på celler i kultur (Sorimachi et al. 2001). NB - denne artikkelen undersøkte ikke evt. effekt av AbM mycelium på virusinfeksjonen som sådan. Ellers er det ikke 15 tilgjengelig engelsk-språklige rapporter i offentlige databaser som dokumenterer andre helseeffekter av AbM, heller ikke ovenfor infeksjoner.

Matsoppen *Agaricus blazei* Murill (AbM), som vokser naturlig utenfor São Paulo, Brasil, har de siste 10-årene blitt 20 dyrket kunstig og brukt i helsekost i Japan for å beskytte mot en rekke av de ovenfor nevnte sykdommer, inkludert kreft. Selv om slik anvendelse av denne soppen er kjent, er det ingen selvfølge at soppen også skal virke mot bakterielle infeksjoner. Mange helsekostprodukter er regnet 25 for å kunne virke kurerende og forebyggende på sykdommer uten at dette har blitt dokumentert. Videre er det ikke umiddelbart innlysende at selv om et produkt er kjent for å forsterke immunsystemet, vil det samme produktet være virksomt mot bakterielle infeksjoner. Heller ikke er det åpenbart at effekten av β -glukaner generelt ville tilsi at 30 ekstrakter fra soppen *Agaricus blazei* Murill skulle være virksomt mot bakterielle infeksjoner, og heller ikke at AbM faktisk er mer virksomt enn øvrige naturlige medikamenter på dette område.

Effekten av ekstrakter av AbM mot bakteriell infeksjon i mus er i henhold til foreliggende opprinnelse undersøkt i en modell hvor musene utsettes for dødelig infeksjon med pneumokokker (*Streptococcus pneumoniae* serotype 6B). AbM-ekstrakt ble gitt via mavesonde til musene fra 24 timer til umiddelbart før innsprøyting av pneumokokker i bukhulen.

Det ble tatt blodprøver daglig til bakteriedyrkning fra en lårvene på musene og overlevelsesraten av musene ble notert. Det ble funnet at en dose AbM-ekstrakt gitt med mavesonde, enten 24, 2 eller 0 timer før bakteriesmitte, reduserte bakterietallet i blod og øket overlevelsen av dyrene i forhold til dyr som fikk saltvann via mavesonde. Hele 50% av dyrene som fikk et AbM ekstrakt 24 timer før smitte overlevde dag 10 mot 13% av kontrolldyrene dag 7.

Dette viser at ekstrakt fra AbM kan brukes som beskyttelse mot og evt. behandling av pneumokokkinfeksjon.

I en tid med økende antibiotikaresistens vil AbM kunne være et naturlig alternativ eller supplement til antibiotika og evt. andre anti-infeksjonsmidler, men med færre bivirkninger og positiv bieffekt som kreftbeskyttende substans.

Pneumokokken, *Streptococcus pneumoniae*, er en gram-positiv diplokokk som forårsaker potensielt dødelige sykdommer som blodforgiftning (sepsis) og hjernehinnebetennelse, men også mindre alvorlige infeksjoner som lunge-, mellomøre- og bihulebetennelse. Det finnes 90 undergrupper (serotyper) av pneumokokker, deriblant serotype 6B (Henrichsen 1979) som har moderat infeksjonsfremkallende evne (virulens) og derfor gir et forholdsvis langstrakt, men likevel dødelig, sykdomsforløp i forsøksmus (Aaberge et al. 1995). Siden hyppigheten av antibiotikaresistente bakterier, slik som multiresistent *S. pneumoniae*, er en fare for folkehelsen og antibiotika om få 10-år trolig har ytterligere redusert eller manglende effekt, burde man forsøke å finne gode alternative forbyggende og behandlende prinsipper.

β-glukaner er kjente immunmodulerende substanser (Riggi & DiLuzio, 1961; Bøgwald et al., 1984) og hovedkomponenter i celleveggen i mugg og gjærssopp. β-glukaner har anti-infeksjon (Reynolds et al., 1980; Franek et al., 1992) og anti-kreft (Tagucho et al., 1983; Ohno et al., 1987) effekter i dyremodeller. Et 1,3-β-glukan i fruktlegemet i AbM kan være soppens anti-kreft prinsipp) (Ohno et al. 2001).

Det er tidligere funnet at β-glukaner (bla. SSG fra soppen *Sclerotinia sclerotiorum* og fra gjærssopp), samt et sukkermolekyl fra groblad, *Plantago major* L., beskytter mot infeksjon med BCG og pneumokokker i musemodeller (Hetland et al., 1998; Hetland et al. 2000a, b, Hetland 2003). Disse effektene ble observert etter injeksjon av substansene i musenes bukhule, men ikke bekreftet etter sondeforing.

Forsøk viste at den beskyttende effekten skyldtes stimulering av det medfødte immunsystemet hvor makrofagen er en sentral immuncelle. Det er også vist at SSG og MacroGard® fra gjærssopp hemmer oppvekst av tuberkelbakterien, *Mycobacterium tuberculosis* i makrofagcellekulturer (Hetland & Sandven, 2002).

Målet med foreliggende oppfinnelse er å anvende et AbM-ekstrakt til fremstilling av et medikament som beskytter mot bakterielle infeksjoner eksemplifisert ved dødelig pneumokokkinfeksjon hos mus med serotypen 6B. Dette ble gjort ved å tilføre pneumokokkene ved hjelp av mavesonde til musene. Effekt av AbM-ekstrakt ble vurdert ut fra bakterietall i veneblod og overlevelsesrate av dyrene.

Det er videre et mål for foreliggende oppfinnelse å anvende et ekstrakt fra soppen *Agaricus blazei* Murill til fremstilling av et medikament som bekjemper eller linder allergi hos pattedyr, spesielt mennesker.

Allergi er et stadig økende problem i den vestlige verden, deriblant Norge. Ekstrakter fra soppen *Agaricus blazei* Murill (AbM) brukes, som nevnt ovenfor, tradisjonelt i

Japan mot flere sykdommer, blant annet kreft, og effekten av AbM mot en krefttype er dokumentert. AbM inneholder immunstimulerende polysakkarider så som β -glukaner, og disse er tidigere vist å virke immunmodulerende og å gi den 5 nevnte beskyttelsen.

Som bakgrunn for den overraskende oppdagelsen at ekstrakter fra soppen *Agaricus blazei murill* vil det kort oppsummeres de følgende forhold. Immunsystemet deles inn i det medfødte (som, uten å være bundet av eventuelle teorier, AbM 10 tilsynelatende påvirker) og det adaptive immunsystem. Dette deles igjen inn i T-hjelper-celle-1, -2 og -3-respons 15 er (Th1, Th2 og Th3), hvor Th1-responsen blant annet er viktig for anti-infeksjon- og anti-tumor-forsvaret, Th-2 for anti-parasitt og anti-forkastelses-forsvaret, men fremmer allergi, og Th-3 gir anti-inflammasjon (beten- 20 nelsesdemping) og fremmer nydannelse av vev. I tillegg er det nå sterkt fokus på regulatoriske T-hjelper-celler. Ifølge T-hjelper-celle-1 (Th1)/Th2-paradigmet er disse responsene inverst proporsjonale fordi Th1 vil hemme Th2 og 25 omvendt slik at en høy Th1-respons er forenlig med en lav Th2-respons.

Det er, som nevnt ovenfor, funnet at AbM-ekstrakt er virksomt overfor infeksjoner eksemplifisert ved pneumokokk-infeksjon i en musemodell. Det er imidlertid indikasjoner 25 som peker mot at det finnes andre substanser i AbM som er vel så viktige som glukaner for den aktuelle anti-infeksjonseffekten som er påvist. Siden anti-infeksjonseffekten skyldes en høy Th1-respons, vil det ut fra den virkning av immunsystemet som er forklart ovenfor, forvents en samtidig 30 hemmet Th2-respons. Da allergi er resultatet av en høy Th2-respons, har AbM-ekstraktet overraskende også en stimulerende effekt på Th2-responsen, noe som er overraskende og uventet ut fra en forventet lav Th2-respons 35 basert på den beskyttende effekten AbM-ekstraktet har mot infeksjoner.

For å undersøke effektene AbM har for å hemme utvikling av allergi, ble det gjort forsøk med en musemodell som ble immunisert med modellallergenet ovalbumin (OVA). Nivå av IgE og IgG1 (Th2-allergisk respons) og IgG2a (anti-infeksjons/kreftrespons) anti-OVA-antistoffer ble målt i musenes serum ved avslutning av forsøket. Det ble også undersøkt nivå av signalsubstanser (cytokiner) som utskilles til blod fra stimulerte immunceller, noe som vil indikere den aktuelle (Th1 (INF γ , IL-12), Th2 (IL-5, IL-10, IL-13) eller 10 Th3 (TGF β) -respons. Det er tidligere påvist produksjon av de betennelsesfremmende cytokinene (TNF- α og IL-8) og NO $^-$ (toksisk nitrogenforbindelse) fra AbM-stimulerte makrofager (hvite blodceller som er viktige i det medfødte immunforsvaret) (Sorimachi 2001).

15 De aktuelle forsøk til underbygning av den anti-allergiske effekten av AbM-ekstrakt er gitt under overskriften "Materialer og metoder II, mens de aktuelle forsøk til underbygning av anti-infeksjonseffekten av AbM-ekstrakt er gitt under overskriften "Materialer og metoder I".

20 **UNDERBYGNING AV ANTI-INFEKSJONSEFFEKTEN AV ABM-EKSTRAKT:**

Materialer og metoder I

Mus. Alle dyreeksperiment ble godkjent av den lokale representant for den nasjonale etiske komité for forsøk med dyr og utført i henhold til nasjonal standard fra Landbruksdepartementet. Det ble brukt innavlede mikrobefrie hunnmus av stammen NIH/OlaHsd fra Harlan Olac Ltd., England. Musene var 6 uker gamle ved ankomst og hvilte 1 uke før eksperimentering.

Reagenser

30 Ekstrakter A, B, C, D og E fra AbM mycelium var fra forskjellige japanske produsenter av helsekost. Ekstrakt A ("gold label type") var det høyest rensede produktet og

ekstrakt B ("Katsu type") et mindre renset produkt, begge fra ACE Co., Ltd., Gifu-ken, Japan. Produsentene av AbM-ekstrakt C, D, og E er ikke informert om denne studien og navnene derfor ikke oppgitt. Fosfatbufret saltvann (PBS) 5 ble brukt som kontroll.

Bakterier. En stamme av *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B fra RIVM, Netherland, ble brukt. Den ble holdt frosset og benyttet til smitteforsøk som kjent tidligere (Aaberge et al. 1995).

10 **Blodprøvetaking.** Det ble tatt blodprøver fra den utvendige lårvenen på bakkema (Saphena magna) til musene. Blodet ble så dyrket som kjent tidligere (Aaberge et al. 1995).

Kvantifisering av koloni-formende enheter (CFU) i blod.
Venøst blod (25 µl) ble fortynnet 10-folds i Todd-Hewitt 15 agar, og 25 µl av fortynnet blod ble sådd ut på blodagarplater, som ble inkubert ved 37°C i 5% CO₂. Etter 18 timer ble koloniene tellt.

Eksperimentell prosedyre. To eksperimenter ble utført med 7-9 dyr i hver behandlingsgruppe (Tabell 1, Figurlegende). 20 Volumet av PBS eller AbM ekstrakt til sondeforing var 200 µl. Alle dyr ble blødd på tidspunkter angitt i figurene og blodet ble sådd ut på agarplater. Dyrne ble inspisert daglig og svært syke mus ble avlivet ved nakkestrekk.

Målinger. Dette var bakterieinnhold i perifert blod bestemt 25 vha. *S. pneumoniae* CFU telling, og dyrenes overlevelsesrate.

Statistikk. Parametriske tester ble brukt på normalfordelte data, ellers non-parametriske tester. En-veis repeterte målingers ANOVA/ Tukey's test ble brukt for multiple 30 sammenlikninger, og paret t-test for enkle sammenlikninger. P verdier under 0,05 ble ansett å være statistisk signifikante.

Resultat***Effekt av AbM ekstrakt gitt 2 timer før smitte, på S. pneumoniae serotype 6B infeksjon***

Mus ble gitt PBS eller et av 5 AbM-ekstrakt (A-E) fra forskjellige produsenter via mavesonde 2 t før bukhuleinjeksjon (i.p.) av *S. pneumoniae* serotype 6B. Blodprøver til bakteriedyrkning ble tatt daglig fra lårvenen og sykeligheten til dyrene overvåket. Kun AbM ekstrakt A ga signifikant lavere CFU nivå sammenliknet med PBS kontrollen (p<0.05) (Fig. 1). Overlevelsesraten til mus gitt AbM-ekstrakt A var også høyere enn til mus gitt PBS (p<0.05) (Fig. 2). Selv om ingen kontrolldyr overlevde dag 5 etter smitte, var 38% av dyrene i gruppe A i live etter 6 dager. Blant disse levde fortsatt 25% på dag 7, men måtte avlives pga. nevrologiske komplikasjoner. AbM ekstrakt D viste en tendens til lavere bakterietall i blod og øket overlevelse, men forskjellene var ikke statistisk signifikante i forhold til PBS (Fig. 1, 2).

Effekt av AbM-ekstrakt gitt 24 timer før eller med smitte, på S. pneumoniae 6B- infeksjon

I neste eksperiment ble AbM-ekstrakt A eller PBS gitt enten 24 timer, 2 timer eller umiddelbart før smitte. Selv om funnet ovenfor med AbM-ekstrakt A gitt 2 timer før smitte, ikke var statistisk signifikant, viste eksperiment 2 den samme tendens (Fig. 3, 4). Den forebyggende positive effekten til AbM-ekstrakt A ble statistisk konfirmert når ekstraktet ble gitt 24 timer før smitte, både mht. bakterietall i blod (p<0.05) (Fig. 3) og overlevelsesrate (p<0.05) (Fig. 4). Det var også liknende og signifikante resultater når ekstrakt A ble gitt like før smitte. Faktisk overlevde 38% av dyrene som fikk AbM-ekstrakt A to eller 0 timer før smitte dag 10 i dette forsøket sammenliknet med 10-20% av kontrollene etter dag 7. Best resultat ble oppnådd når ekstrakt A ble gitt 24 timer før smitte da dette

ga en overlevelsesrate etter 10 dager på hele 50% (Fig. 4) i forhold til PBS kontroll etter 7 dager på 13%.

Diskusjon

I motsetning til tidligere eksperimenter med β -glukaner og et sukkerekstrakt fra den sårhelende planten *Plantago major* L. (groblad) gitt i.p. i den beskrevne infeksjonsmodellen i mus, var AbM ekstrakt A vel så effektivt selv når det ble gitt via mavesonde. β -glukanet med den høyeste effekten etter i.p. administrasjon, hadde ikke effekt når det ble gitt via mavesonde til musene i denne pneumokokk-infeksjons-modellen. Dette gjør trolig AbM ekstrakt mer nyttig enn β -glukan fordi det ikke krever sterilisering av produktet for intravenøs injeksjon og dermed strenge GMP (good manufacturing practise) krav, samt at produktet kan inntas utenfor sykehus. Vi har tidligere vist at β -glukanene SSG og MacroGard® også forsterker allergiutvikling i en musemodell (Ormstad et al., 2000, Hetland et al., 2000). AbM-ekstrakt A gitt via mavesonde i samme modell viser ingen slik bieffekt. Tvert imot indikerer resultatene med allergimodellen at AbM-ekstraktet beskytter mot allergiutvikling.

Kurvene for bakterieinnhold i blod steg brattere i forsøk 1 enn 2 pga. injeksjon av det doble antall *S. pneumoniae* CFU i det første (1.92×10^6 CFU) i forhold til det andre ($0,97 \times 10^6$ CFU) eksperimentet. Hensikten var å utfordre dyrne med $100x$ LD₅₀ (dødelig dose for 50% av individene) (= $100x 1,2 \times 10^4$ CFU (Aaberge et al. 1995)) for *S. pneumoniae* serotype 6B. Men fordi antallet CFU som gis er beregnet ut fra antall bakterie CFU som ble nedfrosset etter forrige dyrkning, vil det eksakte antall levende bakterier, dvs. CFU, som injiseres ikke være kjent før dyrkningssvaret av en parallel bakterieprøve foreligger. Det lavere antall bakterier som ble injisert i eksperiment 2 ga også en høyere overlevelsesrate (10-20% etter 7 dager) av kontroll-dyrne i forhold til eksperiment 1 (0% etter 3 dager).

Dette er trolig årsaken til manglende statistisk signifikant forskjell mellom AbM-ekstrakt A og PBS gitt 2 timer før smitte.

Effekten av AbM-ekstrakt A gitt samtidig med smitte, peker 5 også mot en trolig positiv behandlingseffekt av ekstraktet. Det ble ikke gitt i etterkant pga. tidlig høy dødelighet av forsøksdyrene i kontrollgruppen i denne infeksjonsmodellen. Dette vil bli forsøkt i en annen infeksjonsmodell med 10 lavere dødelighet. Siden immunsystemet bruker liknende mekanismer til å bekjempe kreftceller og virusinfiserte celler, nemlig naturlige dreper (NK) celler og cytotoxiske T-lymfocytter, og AbM har effekt ovenfor kreft, vil AbM trolig også ha positiv effekt ovenfor virusinfeksjoner.

AbM vil trolig kunne brukes som supplement til vaksine hos 15 utsatte grupper, for eksempel personer som har fått fjernet milten og som man vet derfor er mer utsatt for å få pneumokokk-lungebetennelse og -blodforgiftning. Andre aktuelle målgrupper kan være turister som skal reise til land med dårlig hygiene eller kirurgiske pasienter hvor det gis 20 forebyggende antibiotikaprofylakse før operasjon. Man kan også tenke seg at mer utstrakt bruk av en "immunstimulerende" substans som AbM vil kunne dempe antibiotikabruk og "overvaksinering" og gi immunsystemet større mulighet til å "utdanne seg" til bekjempelse av mikrober, og slik 25 også ha en dempende effekt på allergiutvikling. I følge hygienehypotesen skyldes den økende allergifrekvensen i vestlige land atbefolkingen skjermes mer for sykdomsfremkallende mikrober. Det faktum at AbM er vist å beskytte mot kreft i en musemodell og det ikke er kjente bivirkninger av 30 AbM ekstrakt hos millioner japanske helsekostbrukere, øker også nytteverdien av AbM som forebyggende/behandlende middel.

Konklusjon

Foreliggende resultater viser at et AbM-ekstrakt beskytter mot dødelig pneumokokk-infeksjon i mus når ekstraktet gis via mavesonde. Kun høyrensete ekstrakter ("gold label") har

5 signifikant effekt. Positiv effekt ble funnet når ekstraktet ble gitt fra 24 timer før til umiddelbart før bakteriesmitte. Dette ble demonstrert vha. lavere bakterietall i blod og øket overlevelsesrate hos dyr som fikk AbM ekstrakt sammenliknet med dyr som fikk saltvann.

10 Det faktum at ekstraktet virker etter inntak via fordøyelsessystemet, gjør AbM svært interessant som et antibakterielt medisinsk middel. AbM-ekstrakt vil kunne forebygge mot og trolig også virke terapeutisk ovenfor infeksjon spesielt med bakterier, men sannsynligvis også andre

15 sykdomsfremkallende mikroorganismer. I en tid med økende antibiotikaresistens vil AbM kunne være et naturlig supplement eller alternativ, med færre bivirkninger, til antibiotika og evt. andre anti-infeksjonsmidler, samt ha positiv bieffekt som kreftbeskyttende substans.

20 Tabellene og figurene anført nedenfor relaterer seg til de forsøk som er beskrevet tidligere.

Tabell 1

Forsøksprotokoll for AbM behandling via mavesonde av NIH/OlaHsd mus infisert med pneumokokker (*Streptococcus pneumoniae*) av serotype 6B.

A) Eksperiment 1: Behandling med forskjellige AbM ekstrakter 2 timer før smitte

Gruppe	Dag 0, -2t	Dag 0, 0t	Dag 10
AbM A	Ekstrakt A	Pn6B 1.9×10^6 CFU	Avslutning
AbM B	Ekstrakt B	Pn6B 1.9×10^6 CFU	Avslutning
AbM C	Ekstrakt C	Pn6B 1.9×10^6 CFU	Avslutning
AbM D	Ekstrakt D	Pn6B 1.9×10^6 CFU	Avslutning
AbM E	Ekstrakt E	Pn6B 1.9×10^6 CFU	Avslutning
PBS	PBS	Pn6B 1.9×10^6 CFU	Avslutning

B) Eksperiment 2: Behandling med AbM A ekstrakt på forskjellige tidspunkt før smitte

Gruppe	Dag -1	Day 0, -2t	Dag 0,	Dag 0, 0t	Dag 10
			0t		
AbM -24t	Ekstrakt			Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning
	A				
PBS -24t	PBS			Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning
AbM -2t		Ekstrakt A		Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning
PBS -2t		PBS		Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning
AbM 0t			Ekstrakt	Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning
			A		
PBS 0t			PBS	Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning

5

Forkortelser: AbM (*Agaricus blazei* Murill), Pn (pneumokokker)

Figurlegende

Fig. 1.

10 Antall pneumokokker av serotype 6B CFU i perifert blod fra NIH/Ola Hsd hunnmus forbehandlet med AbM ekstrakt A-E eller PBS via mavesonde (volum 200 μ l) 2 timer før injeksjon i bukhulen (i.p.) med 1.92×10^6 CFU av pneumokokker type 6B

bukhulen (i.p.) med 1.92×10^6 CFU av pneumokokker type 6B (se Tabell 1). Dyrne ble blødd ved angitte intervaller, prøvene sådd ut og antall CFU opptalt. Døde dyr er angitt som dyr med 1×10^9 CFU i blodet. Datapunktene representerer 5 median verdier fra 8 dyr og viser lavere CFU nivåer i AbM ekstrakt A-behandlete dyr.

Fig. 2.

Overlevelsesrate (median verdier) for musene i Fig. 1. som ble forbehandlet med AbM ekstrakter eller PBS 2 timer før 10 i.p.-smitte med pneumokokker serotype 6B. Datapunktene representerer median verdier fra 8 dyr og viser høyere overlevelse av AbM ekstrakt A-behandlete dyr.

Fig. 3.

Antall pneumokokker av serotype 6B CFU i perifert blod fra 15 NIH/Ola Hsd hunnmus forbehandlet med AbM ekstrakt A eller PBS via mavesonde (volum 200 μ l) 24 eller 2 timer eller umiddelbart før (i.p.) injeksjon med 0.97×10^6 CFU av pneumokokker type 6B (se Tabell 1). Dyrne ble blødd ved angitte intervaller, prøvene sådd ut og antall CFU opptalt. 20 Døde dyr er angitt som dyr med 1×10^9 CFU i blodet. Datapunktene representerer median verdier fra 8 dyr og viser lavere CFU nivåer i AbM ekstrakt A-behandlete dyr. Merk: logaritmisk skala på Y-aksen.

Fig. 4.

25 Overlevelsesrate (median verdier) for musene i Fig. 3. som ble forbehandlet med AbM ekstrakt A eller PBS 24-0 timer før i.p. smitte med pneumokokker serotype 6B. Datapunktene representerer median verdier fra 8 dyr og viser høyere overlevelse spesielt av dyr behandlet med AbM ekstrakt A 24 30 t før smitte.

Fig. 5.

Effekt av AbM p.o. på IgE anti-OVA-nivåer i OVA-immuniserte mus.

Fig. 6.

5 Effekt av AbM p.o. på Ig2a anti-OVA-nivåer i OVA-immuniserte mus.

Fig. 7.

Effekt av AbM på fektal bukhinnebetennelse (peritonitt) hos Balb/c-mus som fikk AbM dag -1 p.o. og 1/8 feces-fortynning 10 i.p. dag 0. Figuren viser overlevelse (Kaplan-Meier-plot).

Fig. 8.

THP-1-cellere stimulert med AbM og endotoksin.

Fig. 9.

15 Figuren viser et "scatter-plot" - F365 Mean - B635 vs F532 Mean - B532 mikroarray av gener som oppreguleres mot gener som nedreguleres under påvirkning av ekstrakt fra *Agaricus blazei murill*.

Det er ifølge foreliggende oppfinnelse foretrukket å gi 20 AbM-ekstraktet med den antibakterielle virkning i kombinasjon med minst et ytterligere medikamentelt middel, hvor det videre er foretrukket at det ytterligere medikamentelle middel er et antibakterielt middel.

Det er også videre foretrukket å gi det foreliggende AbM-ekstrakt som et oralt middel. I denne sammenheng kan 25 ekstrakter bli gitt som sådan, men det kan også kombineres med vanlige bæremidler og eksipienter slik at det kan bli gitt som et flytende middel så som en eliksir, en mikstur,

en tinktur etc. Alternativt kan AbM-ekstraktet bli gitt i form av et fast medikament så som en pille, en tablett, en kapsel, en sugetablett etc.. I denne sammenheng kan medikamentet også bli tilsatt vanlige tilsatsstoffer så som 5 smaksstoffer (sukkere, søtningsstoffer etc.) og fargestoffer.

For ytterligere å underbygge anti-infeksjonseffekten av ekstrakter av AbM ble det etablert at et ekstrakt fra AbM hadde beskyttende effekt også mot bukhinnebetennelse (peritonitt) i Balb/c-mus infisert i.p. med en fecesføtynning. AbM-ekstraktet ble gitt med sonde p.o. 24 timer før inoculasjon i.p. og temperatur (målt ved hjelp av scanning av et temperatur-chip implantert i nakkeskinnet hos musene), bakteriemi i perifert blod og overlevelse ble 15 undersøkt. Det fantes signifikante forskjeller i alle disse parametere i forhold til kontrollmus som var behandlet med fysiologisk saltvann p.o. i stedet for AbM. Fig. 7 viser den positive effekten av AbM på overlevelse av feces-infiserte mus.

20 Monocytter i blod og monocytt-deriverte makrofager i vevene er sentrale immunceller i det medfødte immunsystem som aktive komponenter i Agaricus påvirker. For å undersøke den stimulerende effekt av Agaricus på slike celler ble det benyttet den humane promonocytt-cellelinje THP-1 som ble 25 dyrket i 24 timer ved nærvær eller fravær av 10% steril-filtrert AbM-ekstrakt. Det ble undersøkt både utskillelse av signalsubstanser (cytokiner) fra cellene til cellekul-tursupernatanten og opp- eller nedregulering av gener som 30 koder for cytokiner. Utskilte cytokiner ble målt ved hjelp av ELISA-metodikk og viste at Agaricus-stimulering av cellene økte utskillelse av sentrale betennelsesøkende (pro-inflammatoriske) cytokiner sin interleukin (IL)-6 og IL-8 (blant annet kjemoattraktanter for henholdsvis T-lymfocytter og nøytrofile granulocytter), mens utskillelsen 35 av et sentralt betennelsesdempende (T-celle-regulatorisk) cytokin som TGF β , ble dempet (Fig. 8). Liknende effekt på

IL-6 ble også demonstrert i primære monocyetter fra perifert blod (ikke vist). På den annen side var det ingen utskillelse av IL-4 (allergi-fremmende) eller IL-10 (betennelses-dempende/treg) -cytokin fra cellene.

5 Viktigst er imidlertid funnene gjort ved hjelp av mikroarray-teknikk hvor mRNA (signalarveststoff for enkeltgener) isolert fra celler som er stimulert eller ikke stimulert med en substans, konkurrerer om binding til en probe på en chip hvor de komplementære nukleotidbasene for mRNA til 10 gener man ønsker å undersøke, er påprintet. Der hvor substansen stimulerer ekspresjon av et bestemt gen, vil det dannes flere mRNA-molekyler som utkonkurrerer bindingen til proben av mRNA for dette genet fra ustimulerte celler. mRNA fra stimulerte celler og kontroller er merket med 15 henholdsvis rød og grønn fluorescerende farge som nyttes ved avlesning av resultatet av bindingen ved hjelp av et instrument som kvantifiserer lyssignaler med bølgelengdene for det aktuelle røde og grønne lys. Mikroarray av THP-1-cellere stimulert med AbM-ekstrakt i 24 timer viste kraftig 20 øket oppregulering av gener for pro-inflammatoriske cytokiner som IL-1, IL-8 og TNF α , samt det nyoppdagete gener for styrking av anti-infeksjons- og anti-tumor-forsvaret (Th1 cytokin), nemlig IL-23 α subenhet p19 som inngår i (Th1 cytokinfamilien) IL-12-familien. På den 25 annen side var ikke genet for IL-4 eller IL-10 oppregulert. Fig. 9 viser et slikt mikroarray etter konkurranse mellom binding av genprodukter fra kontrollceller og celler stimulert med AbM-ekstrakt.

Resultatene av disse celleforsøkene viser at AbM-ekstrakt 30 stimulerer anti-infeksjonsforsvaret (øket Th1-respons) og ikke øker et sentralt allergifremkallende cytokin som IL-4 (gir Th2-respons). Når litteraturen så sier at det er en balanse mellom Th1- og Th2-responsene slik at en økning i den ene følges av en senkning av den andre, tilsier dette 35 at en øket Th1-respons gir en senket Th2-respons, slik som det observeres fra resultatet av allergi-musemodellen (se

nedenfor). Det at anti-infeksjonsforsvaret stimuleres av AbM-ekstrakt betyr at kroppens forsvar overfor infeksjoner som sådanne styrkes, det være seg bakterier, virus eller parasitter. Følgelig vil den effekt som er påvist fra AbM-ekstrakt overfor infeksjoner (bakterielle og ikke-bakterielle) og allergier, kombinert med den viten som finnes omkring immunologiske prinsipper, tilsi at AbM-ekstrakt vil ha en generell slik virkning, slik som krevet i de foreliggende patentkrav.

10 **FORSØK TIL UNDERBYGNING AV DEN ANTI-ALLERGISKE EFFEKT AV ABM-EKSTRAKT:**

I forhold til den allergibeskyttende effekt av ekstrakter fra Agaricus blazei Murill ble følgende forsøk foretatt:

Materialer og metoder II

15 **Mus:** Balb/c hunndyr, 6 uker gamle ved ankomst og hvilt 1 uke i dyrestall.

Reagenser: Enzym-fermentert ekstrakt A ("gold labell") av AbM-mycelium fra ACE Co., Ltd., Japan, PBS og OVA.

20 **Blodprøvetaking:** Dyrene ble tomtappet ved endt eksperiment i CO₂-narkose og serum frosset ned ved -20°C.

Eksperimentell prosedyre: Musene (n=8/gruppe) ble sondet med 200 µl av AbM-ekstrakt eller PBS på dag -1. Musene ble så immunisert s.c. i haleroten med OVA + Al₂(OH)₃ (adjuvant) på dag 0 og igjen på dag 20 (forsterkerdose for øket allergirespons). Eksperimentet ble avsluttet etter 26 dager, når IgE anti-OVA-responsen er på topp i denne modellen, etter første OVA-immunisering med hjertepunksjon og tomtapping (for serum) av dyrene under CO₂-anestesi. Serum fra dyrene ble analysert for IgE, IgG1 og IgG2a anti-OVA og nivå av cytokiner, og tomtappet på dag 26.

Målinger:

Nivå av IgE-, IgG1- og IgG2a-antistoffer i serum mot OVA ble målt med ELISA-teknikk. Nivå av cytokiner (INF γ , IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, TGF β) som er typiske for Th1-, Thg2- og Th3-responser, ble målt i serum og i supernatant fra dyrkede bukmakrofager og miltceller fra dyrene. Cytokinmålinger ble ikke utført.

Statistikk av resultatene ble utført som forklart ovenfor.

Det ble fra forsøkene funnet et lavere ($p=0,17$) IgE anti-OVA-nivå i serum fra mus som hadde fått AbM per os i forhold til de som hadde fått PBS (Fig. 5). Dette viser at AbM hemmer allergiutviklingen mot OVA på grunn av hemmet Th2-respons. Dessuten viste resultatene en at IgG2a anti-OVA-nivået var høyere i gruppen som hadde fått AbM i forhold til kontroll (PBS-gruppen) (Figur 6). Dette viser at AbM gir en øket Th1-respons, noe som passer med den lavere Th2-responsen som IgE-analysen viste. IgG1 hadde høyere viste motsatte nivåer. Dette ble riktignok ikke støttet av IgG1 anti-OVA-målingene, men denne testen er under utvikling og er enda ikke helt pålitelig, slik at dette funnet ikke regnes som signifikant. I motsetning til dette er det tidligere funnet at β -glukaner så som scleroglykan (Ormestad et al., 2000) og MacroGard® fra gjærssopp (Instanes et al., submittert) (gitt i.p.) forsterker allergiutviklingen i denne aktuelle musemodellen. Dette viser at det eksisterer andre faktorer enn β -glukan i AbM-ekstrakt som er effektive i dyrene, og dette danner en basis for gjenstanden for foreliggende oppfinnelse, idet det ville bli antatt av fagpersonen at substanser som fremmer en gitt immunprosess ikke ville være virksomme i en motsatt immunprosess (se ovenfor angående virkningene av Th1, Th2 og Th3)

Oppfinnelsen angår således i et andre aspekt anvendelse av AbM-ekstrakt til fremstilling av medikamenter som er egnet

til forebygning eller bekjempelse av allergier hos patte-dyr, spesielt mennesker. Blant aktuelle allergiske reaksjoner som kan forebygges/bekjempes med sammensetninger omfattende ekstrakt(er) fra AbM ifølge foreliggende oppfinnelse, kan det nevnes støvallergi (pollenallergi, høysnue, allergi mot husstøv etc.), matvareallergi (proteinallergier, for eksempel fiskeallergi, melkeallergi, skalldyrsallergi etc.), berøringsallergi (allergi mot dyr så som hunder, katter, etc.).

Referanser

Wasser S and Weiss A (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: Current perspectives (review). *Int J Med Mushrooms*, 1, 31-62.

Ikekawa T (2001). Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms on health care. *Int J Med Mushrooms*, 3, 291-298.

Chen A (2000). A practical guide to the cultivation of *Agaricus blazei*. *The mushroom grower's newsletter IV*: 3.

Huang N-L (1997). Brazilian mushroom (Gee Song Rong). Cultivation of eight rare and precious gourmet mushrooms. Chinese Agr Press, Huang Ed: 95-101.

Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T, Mizuno T, Shimura K, Ito H, Hagiwara T, Nakamura T (1989). Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr Res* 15, 267-273.

Iwade I & Muzuno T (1997). Cultivation of Kawariharatake. *Food rev Int* 13, 383.

Stamets P (2000). The Hime matsutake mushroom of the genus *Agaricus*, *Agaricus blazei* murill. *Growing Gourmet and Med Mushrooms*, 3rd Ed.

Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T (2001). Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biol Pharm Bull* 24: 820-8, 2001.

Sorimachi K, Akimoto K, Ikehara Y, Inafuku K, Okubo A, Yamazaki S. (2001) Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions *in vitro*. *Cell Struct Funct.* 26(2):103-8.

Itoh H, Ito H, Amano H, Noda H. (1994) Inhibitory action of a (1-->6)-beta-D-glucan-protein complex (F III-2-b) isolated from Agaricus blazei Murill ("himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor 5 mechanism. Jpn J Pharmacol. 66(2):265-71.

Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman K, Kobori H, Moriguchi K, Nakashima H, Matumoto Y, Takahara S, Ebina T, Katakura R. (1998) Selective tumoricidal effect of soluble proteoglucon extracted from the basidiomycete, Agaricus blazei Murill, 10 mediated via natural killer cell activation and apoptosis. Cancer Immunol Immunother. 46(3):147-59.

Ebina T, Fujimiya Y. (1998) Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from Agaricus blazei in a double-grafted tumor system in mice. Biotherapy. 11(4):259-15 65.

Takaku T, Kimura Y, Okuda H (2001). Isolation of an antitumor compound from Agaricus blazei Murill and its mechanism of action. J Nutr 131, 1409-1413.

Menoli RC, Mantovani MS, Ribeiro LR, Speit G, Jordao BQ 20 (2001). Antimutagenic effects of the mushroom Agaricus blazei Murill extracts on V79 cells. Muatt res 20, 5-13.

Bellini MF, Giacomini NL, Eira AF, Ribeiro LR, Mantovani MS (2003). Anticlastogenic effect of aqueous extracts of Agaricus blazei on CHO-k1 cells, studying different 25 developmental phases of the mushroom. Toxicol in vitro 17, 465-469.

Sorimachi K, Ikehara Y, Maezato G, Okubo A, Yamazaki S, Akimoto K, Niwa A (2001) Inhibition by Agaricus blazei Murill fractions of cytopathic effect induced by western 30 equine encephalitis (WEE) virus on VERO cells in vitro. Biosci Biotechnol Biochem 65: 1645-7.

Henrichsen J. (1979) The pneumococcal typing system and pneumococcal surveillance. *J. Infection* 1(suppl. 2), 31-37.

Aaberge, I.S., Eng, J., Lermark, G. and Løvik, M. (1995) Virulence of *Streptococcus pneumoniae* in mice: a 5 standardized method for preparation and frozen storage of the experimental bacterial inoculum. *Microb. Pathogen.* 18, 141-152.

Riggi, S. and Di Luzio, N.R. (1961) Identification of a RE stimulating agent in zymosan. *Am. J. Physiol.* 200, 297-300.

10 Bøgwald, J., Gouda, I., Hoffmann, J., Larm, O., Larsson, R. and Seljelid, R. (1984) Stimulatory effect of immobilized glucans on macrophages in vitro. *Scand. J. Immunol.* 20, 355-360.

15 Reynolds, J.A., Kastello, M.D., Harrington, D.G., Crabbs, C.L., Peters, C.J., Jemski, J.V., Scott, G.H. and Di Luzio, N.R. (1980) Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases. *Infect. Immun.* 30, 51-57.

20 Franek J, Malina J, Kratka H. (1992) Bacterial infection modulated by glucan: a search for the host defense potentiation mechanisms. *Folia Microbiol (Praha)*. 37(2):146-52.

25 Taguchi, T., Furue, H., Kimura, T., Kondo, T., Hattori, T. and Ogawa, N. (1983) Clinical efficacy of lentinan on neoplastic diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* Biotherapy 166, 181-187.

30 Ohno, N., Kurachi, K. and Yadomae, T. (1987) Antitumor activity of highly branched (1→3) beta-D-glucan, SSG, obtained from *Scerotinia sclerotiorum* IFO 9395. *J. Pharmacobiodyn.* 10, 478-486.

Hetland, G., Løvik, M. and Wiker, H.G. (1998) Protective effect of β -glucan against mycobacterium bovis, BCG infection in Balb/c mice. *Scand. J. Immunol.* 47, 548-553.

5 Hetland G, Ohno, N, Aaberge Is, Løvik M. (2000a) Protective effect of β -glucan against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27:111-116.

10 Hetland G, Samuelsen AB, Løvik M, Paulsen BS, Aaberge IS, Goeng E-C, Michaelsen TE. (2000b) Protective effect of *Plantago major* L. pectin polysaccharide against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Scand J Immunol* 52: 348-355.

15 Hetland G (2003). Anti-infective action of immuno-modulating polysaccharides (β -glucan and *Plantago major* L. pectin) against intracellular (*Mycobacteria* sp.) and extracellular (*Streptococcus pneumoniae* sp.) respiratory pathogens (Review) *Curr Med Chem - Anti-Infec Agens* 2, 135-147.

20 Hetland G, Sandven P. (2002) β -1,3-glucan reduces growth of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophage cultures. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 33: 41-45.

25 Ormstad H, Groeng E-C, Løvik M, Hetland G. (2000) The fungal cell wall component β -1,3-glucan has an adjuvant effect on the allergic response to ovalbumin in mice. *J Toxicol Environ Health, Part A*, 61, 55-67.

30 Hetland G, Ormstad H, Ohno N, Løvik M. Fungal β -1,3-glucan SSG from the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* adjuvates the allergic response to ovalbumin in mice. In: *Healthy Buildings 2000: Exposure, Human Responses and Building Investigations*. Eds.: Seppänen O, Säteri J. Publisher: Gummerus Kirjapaino SIY Indoor Air Information Oy, Finland Vol. 1, pp. 245-250.



P a t e n t k r a v

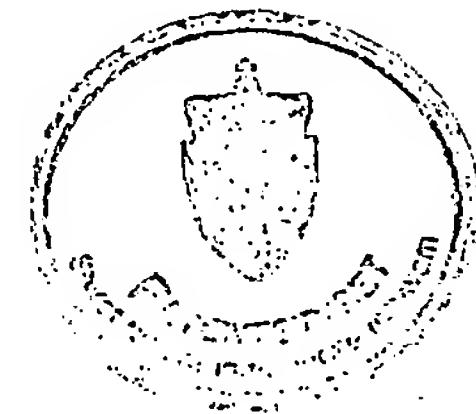
1. Anvendelse av *Agaricus blazei* Murill (AbM) ved fremstilling av et medikament til bekjempelse eller forebygging av bakterielle og ikke-bakterielle infeksjoner og/eller 5 allergier i pattedyr.
2. Anvendelse ifølge krav 1 hvor den aktuelle ikke-bakterielle infeksjon er forårsaket av en parasitt eller et virus.
3. Anvendelse ifølge krav 1, hvor den bakterielle infeksjonen er forårsaket av pneumokokker. 10
4. Anvendelse ifølge krav 3, hvor pneumokokken er *Pneumococcus pneumoniae*.
5. Anvendelse ifølge krav 1 hvor allergien er en valgt fra gruppen støvallergi (pollenallergi, høysnue, allergi mot husstøv etc.), matvareallergi (proteinallergier, for eksempel fiskeallergi, melkeallergi, skalldyrsallergi etc.), berøringsallergi (allergi mot dyr så som hunder, katter, etc.). 15
6. Anvendelse ifølge krav 1 - 5, hvor medikamentet er et oralt medikament. 20
7. Anvendelse ifølge krav 1 - 5, hvor medikamentet er et intravenøst preparat.
8. Anvendelse ifølge krav 1 - 7, hvor medikamentet omfatter minst et ytterligere medikamentelt middel. 25
9. Anvendelse ifølge krav 8, hvor det ytterligere medikamentelle middel er et antibakterielt middel.
10. Anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, hvor pattedyret er et menneske.



2004-10-25

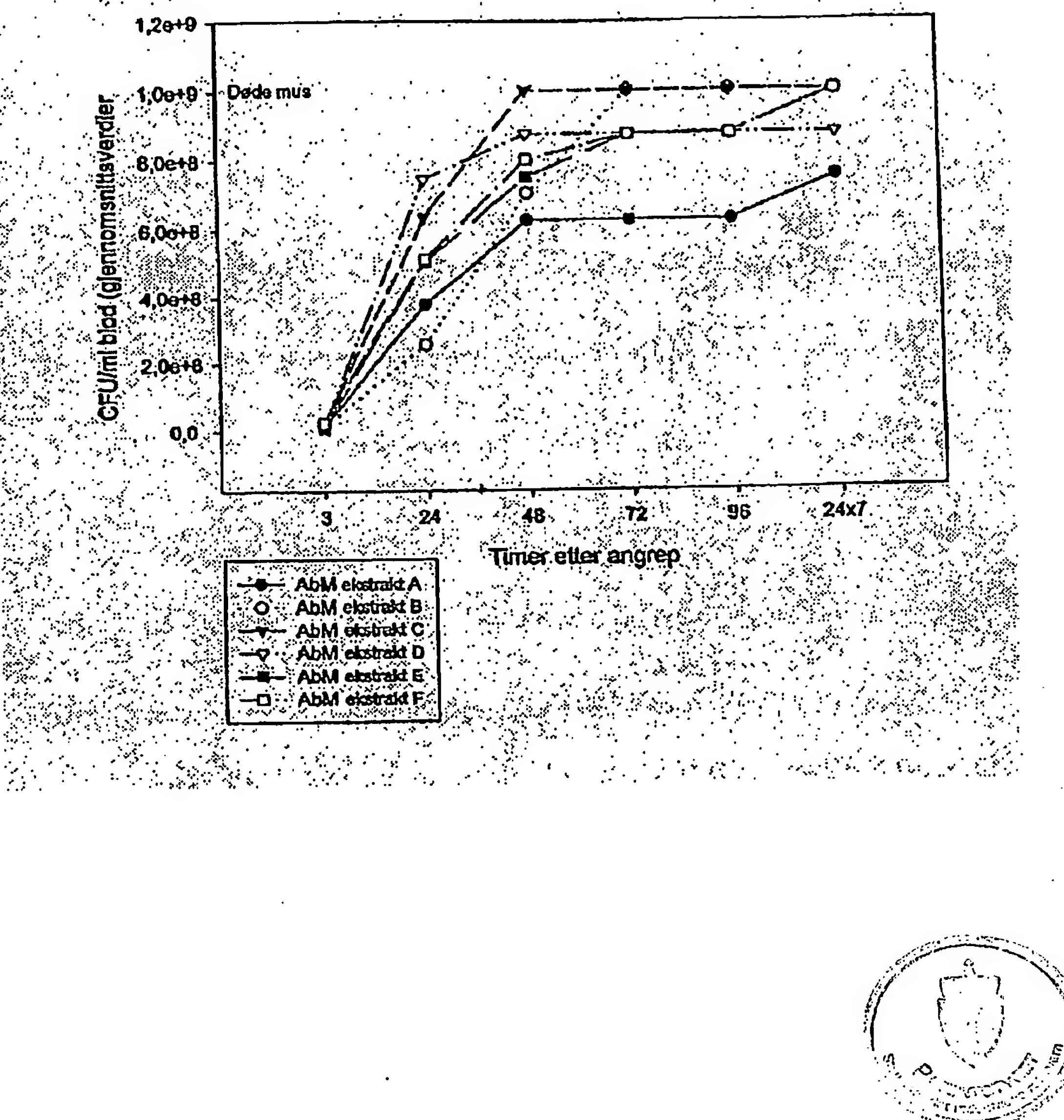
S a m m e n d r a g

Foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av soppen *Agaricus blazei murill* (AbM) ved fremstilling av et medikament til bekjempelse eller forebygning av bakterielle og ikke-bakterielle infeksjoner (for eksempel parasitter eller virus) i pattedyr samt til bekjempelse forebygning av allergi hos pattedyr. Eksempelvis kan en slik infeksjon være forårsaket av pneumokokker og enda mer spesielt hvor pattedyret er et menneske.



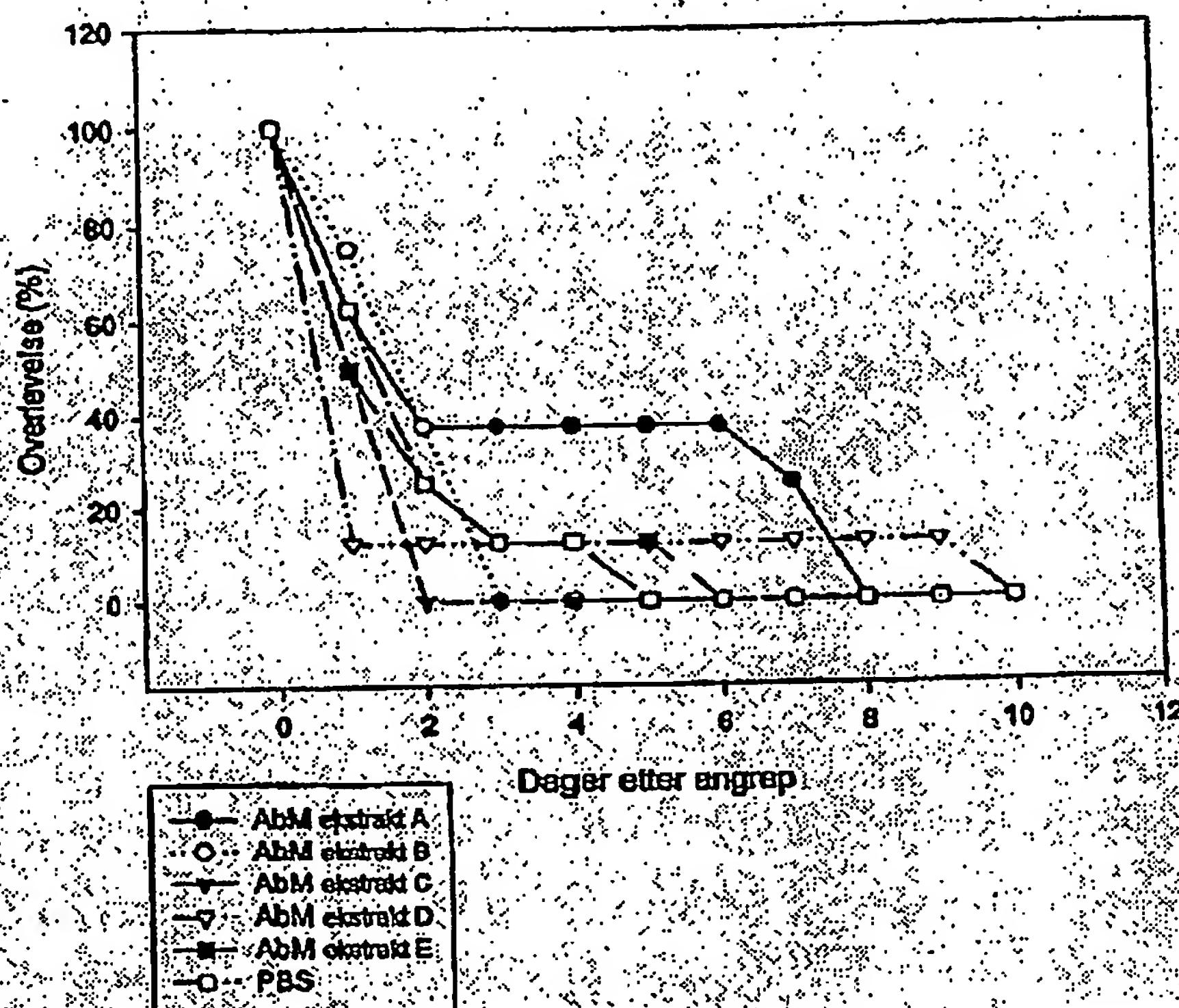
Figur 1.

Bakteriemi i NIH/Ola-mus gitt *S. pneumoniae* 6B i.p. 2 timer etter forskjellige AbM-ekstrakter p.o.



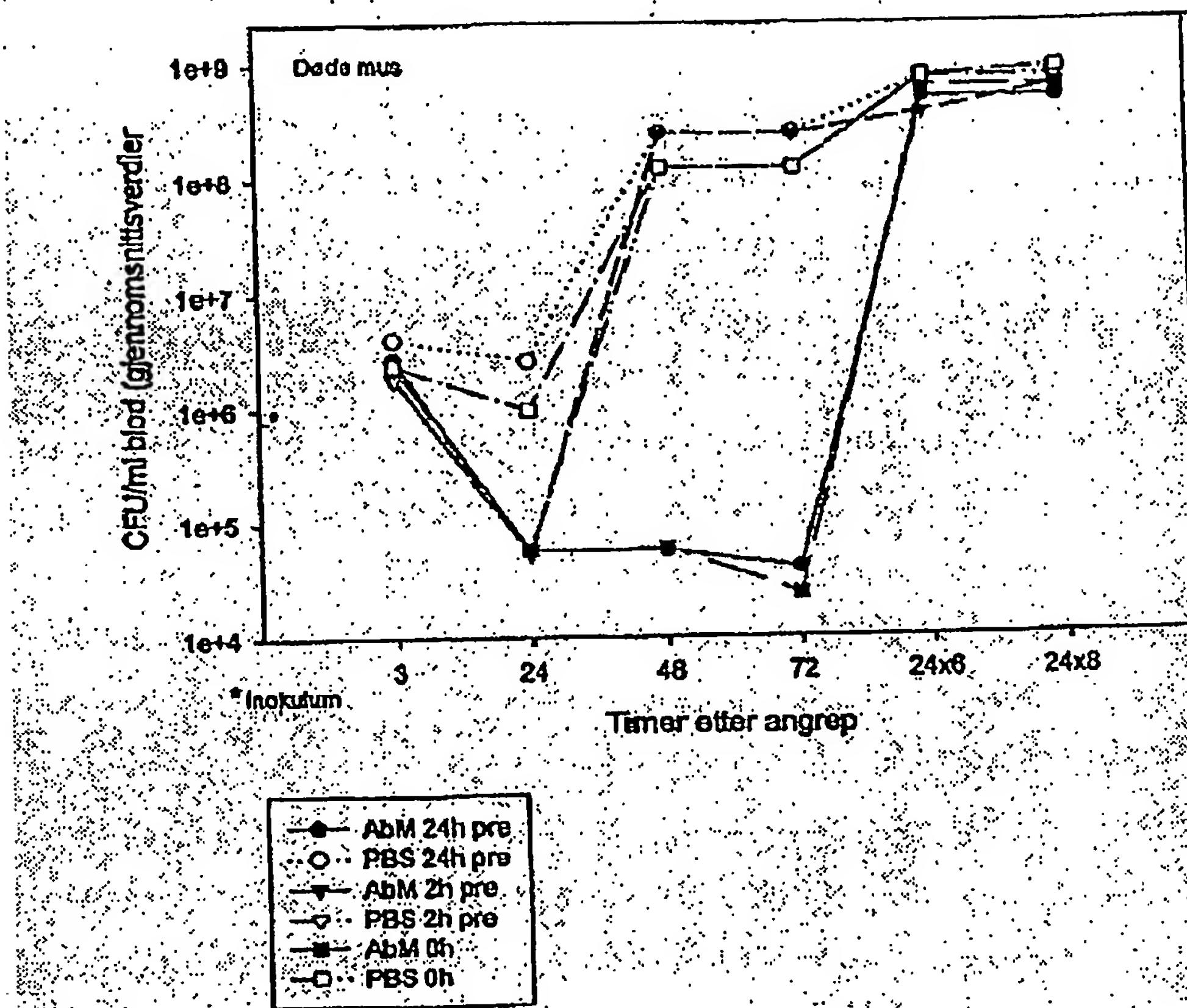
Figur 2.

Overlevelse av NIH/Ola-mus gitt S. pneumoniae 6B i.p. 2 timer etter forskjellige AbM-ekstrakter p.o.



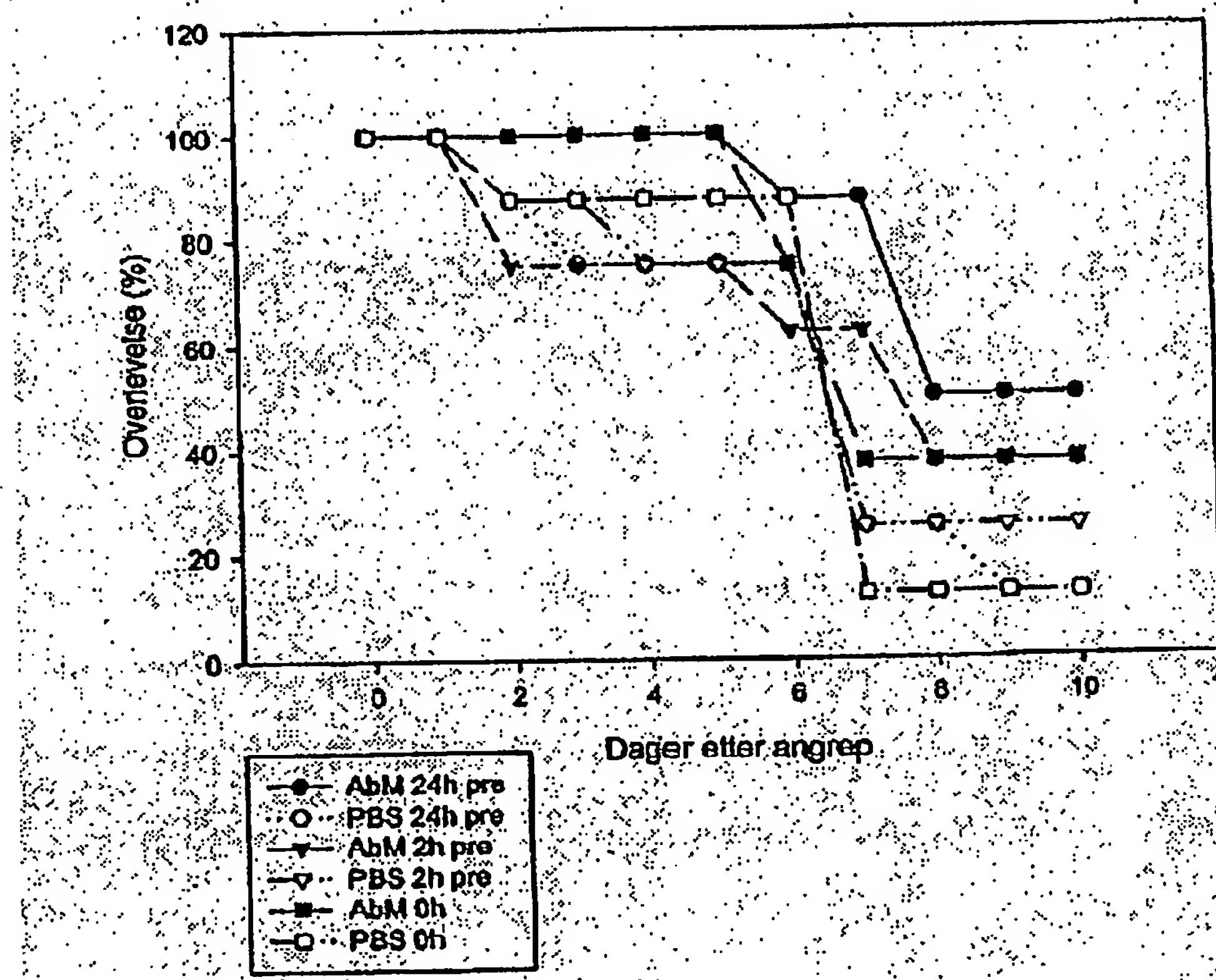
Figur 3.

Bakteriemi i NIH/Ola-mus gitt *S. pneumoniae* 6B i.p. 24 timer eller 2 timer eller sammen med AbM-ekstrakt A p.o.



Figur 4.

Overlevelse av NIH/Ola-mus gitt *S. pneumoniae* 6B i.p. 24 timer, eller 2 timer etter, eller sammen med AbM-ekstrakt A p.o.



Effect of AbM p.o. on IgE anti-OVA levels in OVA-immunized mice

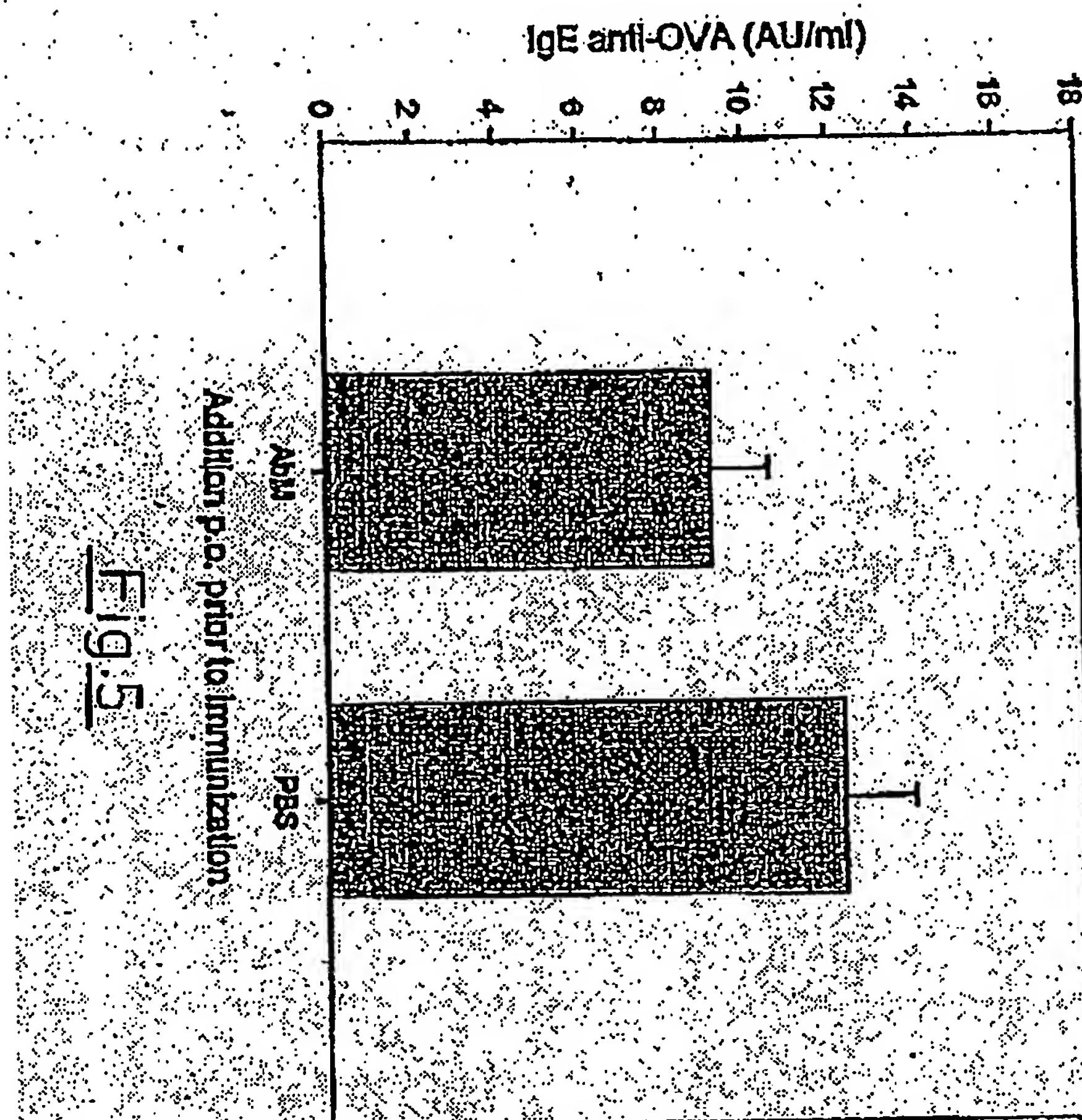


FIG.5



Effect of AbM p.o. on IgG anti-OVA levels in OVA-immunized mice

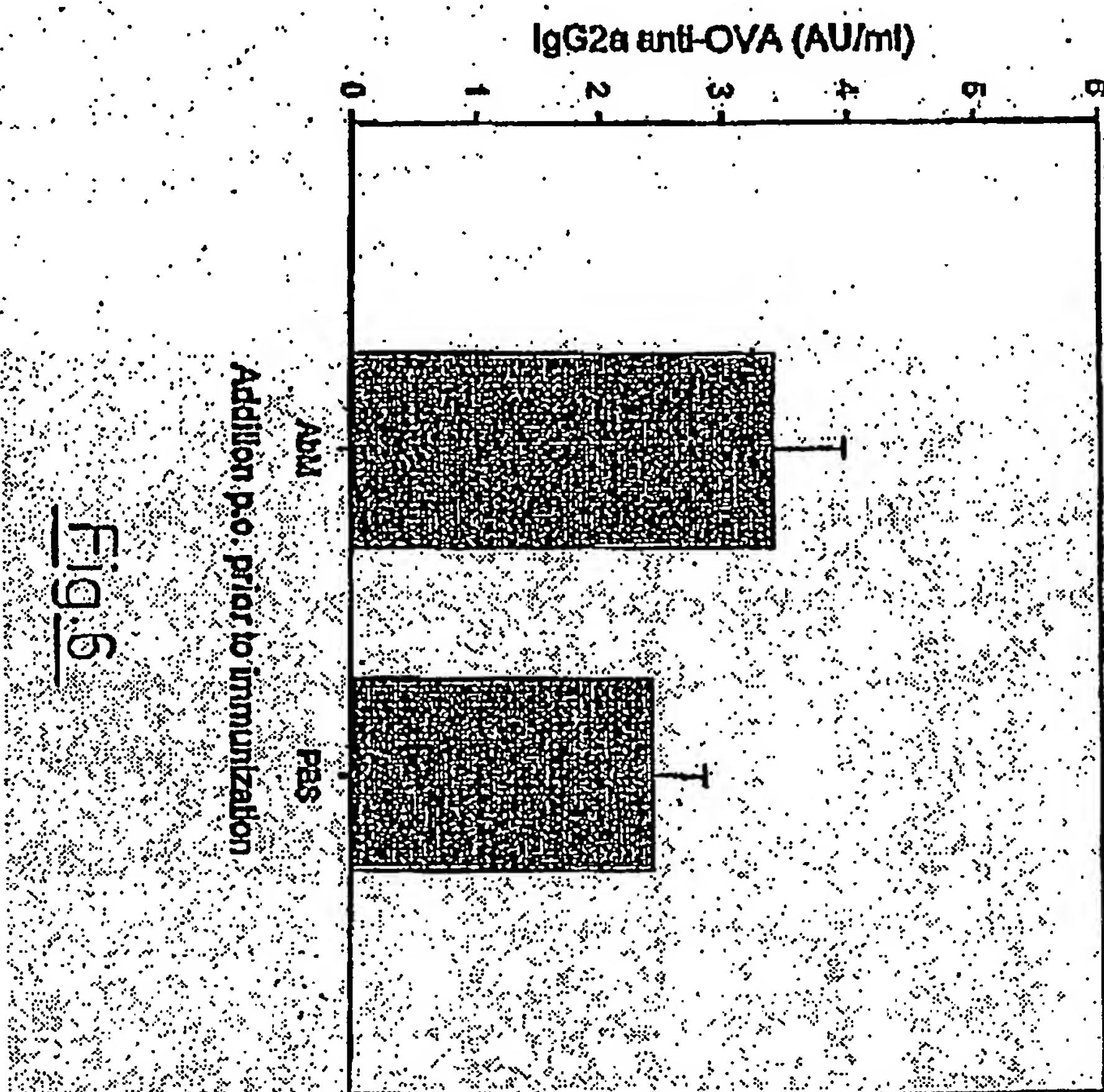


Fig. 6

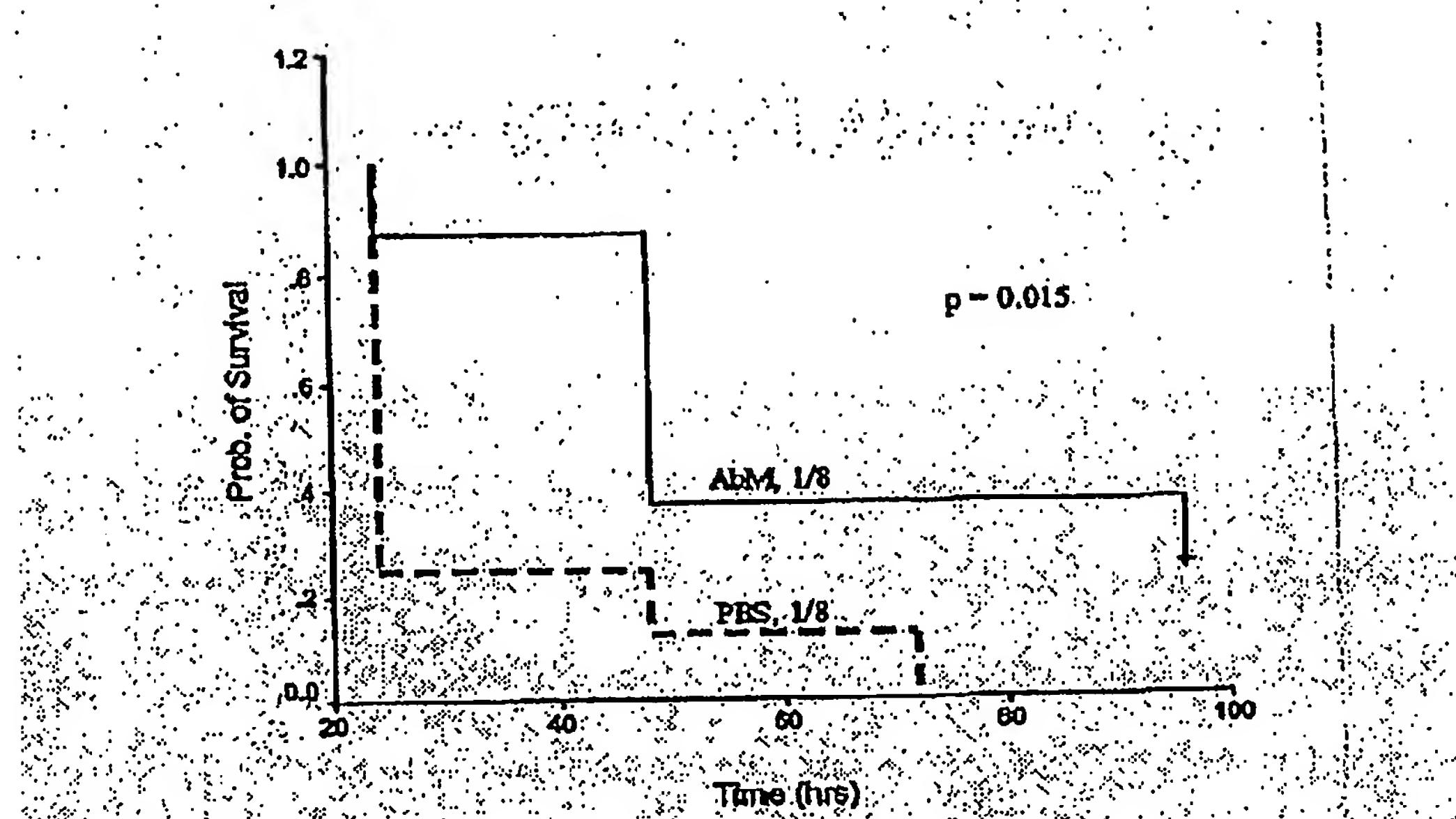


Fig. 7.

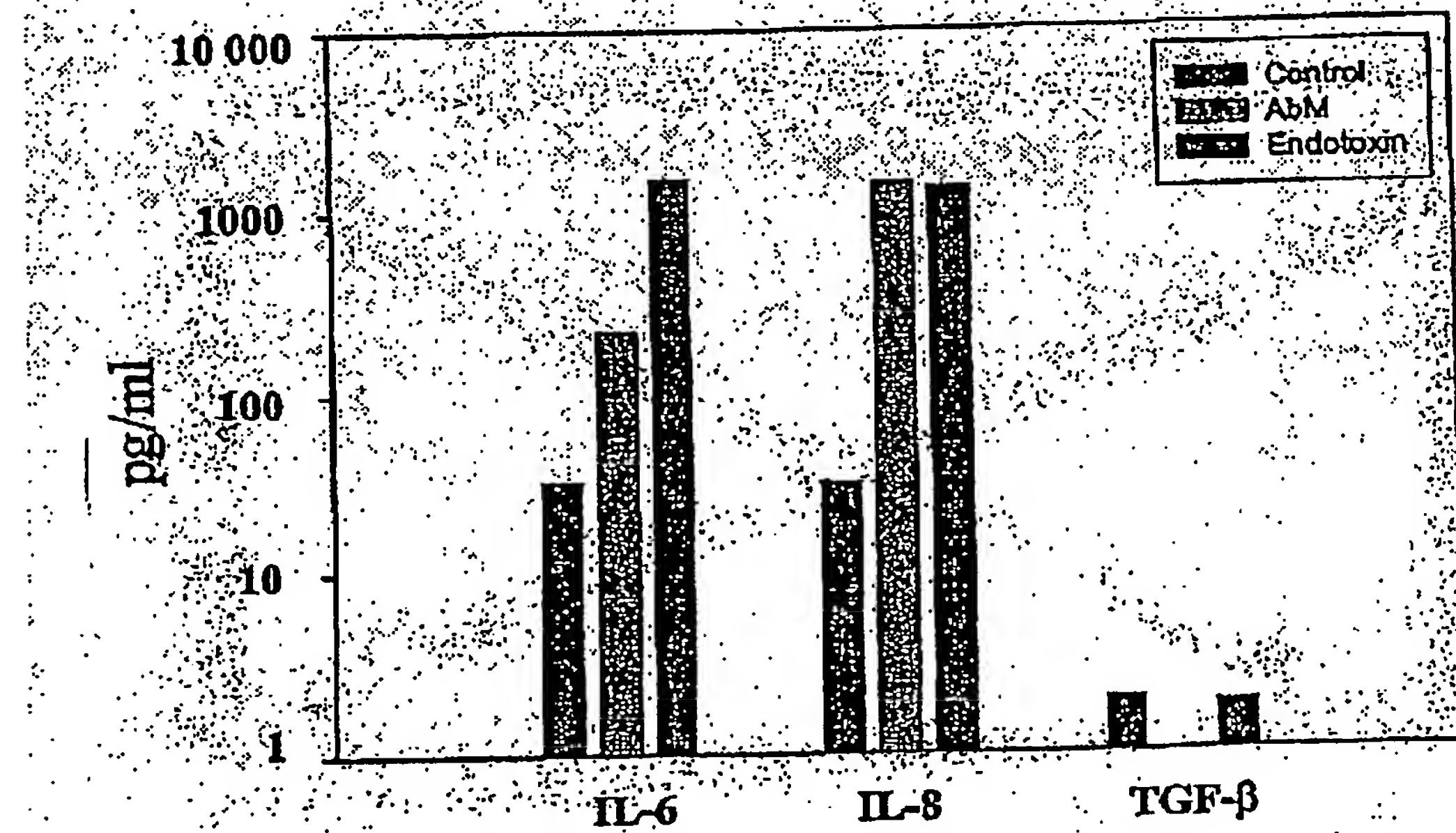


Fig. 8



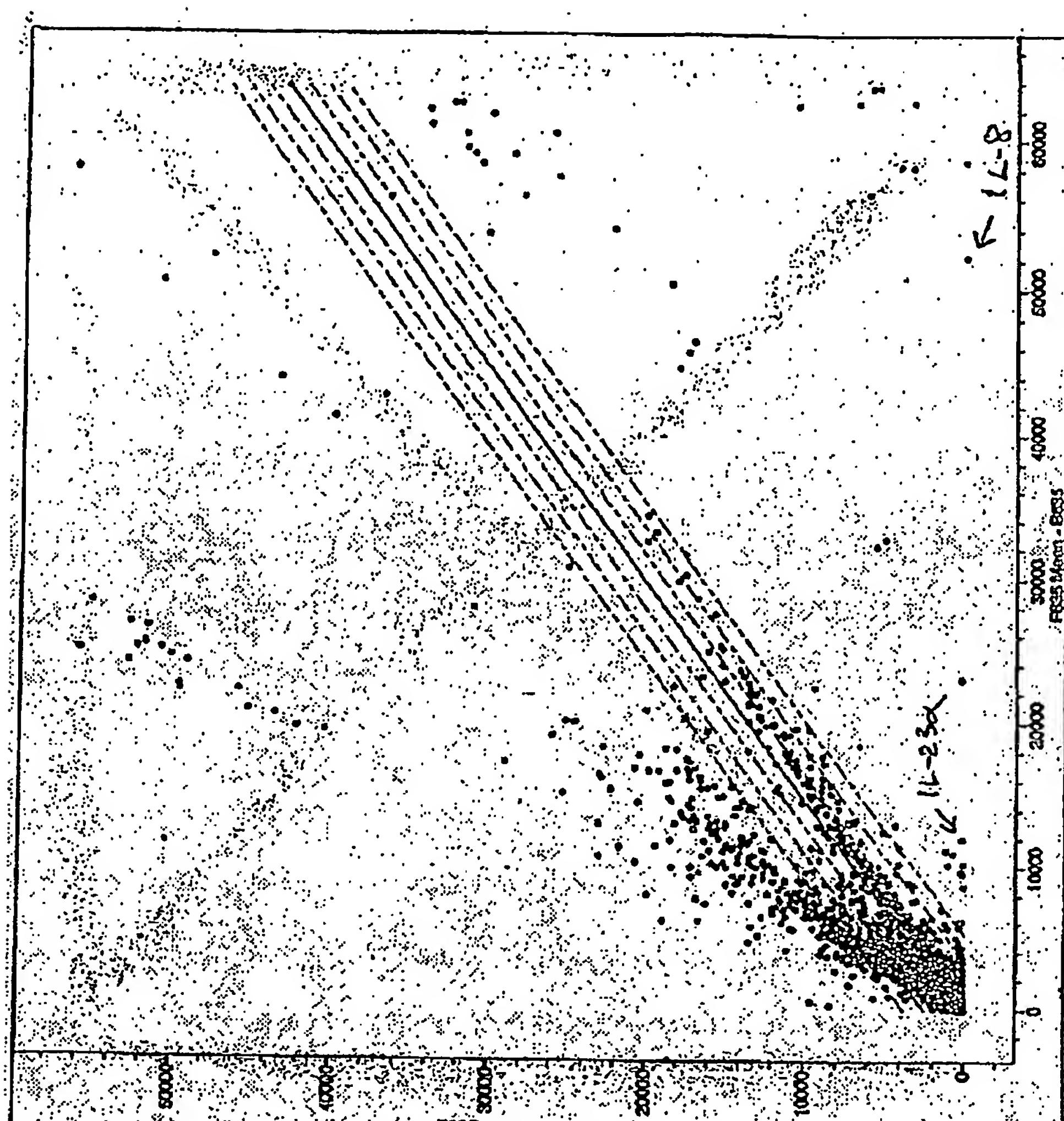


Fig. 9

